维生素E对日本沼虾生长性能、抗氧化性能及抗氨氮胁迫的影响

孔有琴[1] 丁志丽[1] 张易祥[1] 罗 娜[1,2] 叶金云[1*]

（1.浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室，中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室，湖州师范学院生命科学学院，湖州 313000；2.大连海洋大学水产与生命科学学院，大连 116000）

摘 要：本试验旨在研究饲料中维生素E水平对日本沼虾（*Macrobrachium nipponense*）幼虾生长性能、抗氧化性能和抗氨氮胁迫的影响。选择健壮、平均初始体重为（0.119±0.004）g的900只日本沼虾幼虾，随机分为6个组，每组3个重复，每个重复50只。以维生素E乙酯为添加形式，配制6组维生素E实际含量分别为18.31、37.94、66.07、120.25、212.68和388.96 mg/kg的半纯化饲料（分别记为VE1、VE2、VE3、VE4、VE5和VE6组），饲喂8周，随后进行24 h氨氮胁迫试验。结果显示：1）各组日本沼虾成活率（SR）无显著差异（P>0.05）；随饲料维生素E水平增加，日本沼虾增重率（WGR）呈先增加后下降的变化趋势，VE4组最高，且显著高于VE1组（P<0.05）；饲料系数（FCR）变化趋势则与WGR相反，VE4组最低，且显著低于VE1组（P<0.05）。2）氨氮胁迫前，各组日本沼虾肝胰腺中丙二醛（MDA）含量随饲料维生素E水平的增加呈先下降后上升的变化趋势，在VE3组达到最低，且显著低于VE1、VE5和VE6组（P<0.05）；各组日本沼虾肝胰腺总超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活力和总抗氧化力（T-AOC）随饲料维生素E水平的增加呈先上升后下降的变化趋势。VE1和VE6组日本沼虾硫氧还蛋白（*Trx*）mRNA表达量较高，硫氧还蛋白还原酶（*TrxR*）mRNA表达量则较低。VE3组热休克蛋白60（*HSP*60）mRNA表达量显著低于其他各组（P<0.05），VE1组热休克同源蛋白70（*HSC*70） mRNA表达量显著低于其他各组（P<0.05），VE1和VE2组热休克蛋白90（*HSP*90）mRNA表达显著高于其他各组（P<0.05）。3）氨氮胁迫后，各组日本沼虾SOD、CAT、GSH-Px活力，MDA含量，*Trx*、*TrxR*和*HSC*70 mRNA表达量的变化趋势与胁迫前相似，*HSP*60和*HSP*90 mRNA表达量变化与胁迫前相反。胁迫可降低日本沼虾肝胰腺

收稿日期：201-02-07

基金项目：浙江省重大科技专项计划项目（2014C02011）；浙江省自然科学基金项目（LY16C190006）；国家自然科学基金项目（31402308）；湖州市自然科学资金项目（2015YZ06）；浙江省重点研发计划项目（2015C03018）

作者简介：孔有琴（1977—），女，浙江长兴人，讲师，博士，主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: susankuq@zjhu.edu.cn

*通信作者：叶金云，研究员，博士生导师，E-mail: yjy@zjhu.edu.cn

GSH-Px 活力、T-AOC 及 *Trx*、*TrxR* mRNA 表达量，提高 MDA 含量及 VE4、VE5 和 VE6 组 SOD 活力。由此可见，饲料中添加 120.25 mg/kg 维生素 E 对日本沼虾的生长具有积极地促进作用，饲料中添加 66.07、120.25 和 212.68 mg/kg 的维生素 E 可提高日本沼虾抗氧化性能和抗氨氮胁迫能力。

关键词：日本沼虾；维生素 E；生长；抗氧化力；氨氮

中图分类号：S966.12

维生素 E（vitamin E）是维持动物体正常生长和生理功能所必需的一种微量营养素[1]。生理上，维生素 E 参与机体的抗氧化、细胞信号传导、生殖发育、免疫调节、抗应激等过程[2-3]。在水产动物的营养生理研究中，维生素 E 的抗氧化和抗应激作用一直备受研究者的关注。如饲料中添加适量的维生素 E 可显著提高斑节对虾（*Penaeus monodon*）肝胰腺的超氧化物歧化酶（SOD）活力，降低丙二醛（MDA）含量[4]；显著提高凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）SOD、过氧化氢酶（CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活力[5]。与此同时，维生素 E 对农药[6-7]、重金属污染[8]、拥挤应激[9]及高脂饲料[10]等产生的胁迫具有有效的保护作用。

随着水质污染加剧和集约化养殖的快速发展，氨氮成为水产动物养殖环境中最常见的胁迫因子之一。氨氮胁迫可严重影响机体的生长、呼吸、抗氧化和免疫等生理功能[11-13]，过量的氨氮被认为是环境因素导致虾蟹疾病的重要原因之一[14]。研究发现，营养调控是缓解胁迫的一种简单、有效的技术手段之一[15]。如维生素 E 可有效缓解氨氮胁迫对青鱼（*Mylopharyngodon piceus*）[16]、云纹石斑鱼(*Epinehelus moara*)[17]的不利作用。

日本沼虾（*Macrobrachium nipponense*）俗称河虾、青虾，属节肢动物门、甲壳纲、十足目、长臂虾科、沼虾属[18]。日本沼虾因为其口味鲜美、营养价值高，成为中国、日本和其他东南亚国家主要淡水养殖品种之一，在我国的养殖区主要集中于长江中下游一带，比如浙江、江苏、安徽等省份[19]。据最新统计，2015 年全国日本沼虾的年产量达到 26.5 万 t，比 2014 年增长了 2.88%[20]。日本沼虾养殖业的快速发展推动了对其生物学特性、营养生理学研究的需求，但目前对日本沼虾的营养生理的研究还较滞后，现有的研究多集中于蛋白质[19-21]、脂类[22]、部分微量元素[23-24]等，关于维生素 E 的营养生理学研究还鲜有报道。本文拟用含不同维生素 E 含量的饲料投喂日本沼虾幼虾，探讨维生素 E 对日本沼虾生长性能、

抗氧化性能和抗氨氮胁迫的影响，以期为该虾配合饲料的开发和绿色健康养殖提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验用日本沼虾购自于浙江湖州南浔一养殖场，正式试验前先暂养 1 周，使日本沼虾适应养殖环境。而后选择健壮活泼、平均初始体重为（0.119±0.004） g 的 900 只日本沼虾幼虾，随机分为 6 个组，每组 3 个重复，每个重复 50 只。日本沼虾幼虾随机放入到 18 只体积为 300 L 的水槽中进行养殖试验，每个水槽放 50 只日本沼虾。正式养殖试验共持续 8 周。

1.2 试验饲料

以酪蛋白和鱼粉作为蛋白质源，鱼油和大豆油作为脂肪源，玉米淀粉作为糖源，配制基础饲料，基础饲料组成及营养水平见表 1。按照试验设计，添加相应含量维生素 E 乙酯（Sigma，美国）到基础饲料中，配制 6 组试验饲料（分别记为 VE1、VE2、VE3、VE4、VE5 和 VE6 组），维生素 E 水平分别为 0、25、50、100、200 和 400 mg/kg。试验饲料按以下方法进行制备：首先用粉碎机将原料粉碎并过 80 目筛，然后按需要准确称取各种原料，逐级均匀混合，加入鱼油和豆油再次混匀，同时添加一定的水搅拌混匀，最后用小型饲料造粒机制成粒径为 1.5 mm 的颗粒饲料，置于 40 ℃烘箱烘干至水分含量为 10%左右，用自封袋封装后于−20 ℃保存备用。

表 1 基础饲料组成及营养水平（风干基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
酪蛋白 Casein	30.0
鱼粉 Fish meal	20.0
玉米淀粉 Corn starch	26.0
鱼油 Fish oil	4.0
大豆油 Soybean oil	2.0
无维生素 E 的维生素混合物 Vitamin E-free vitamin	2.0

mix[1)]	
矿物质混合物 Mineral mix[2)]	3.0
诱食剂 Attractant[3)]	3.0
胆固醇 Cholesterol	0.5
氯化胆碱 Choline chloride	0.5
卵磷脂 Lecithin	0.5
纤维素 Cellulose	6.5
羧甲基纤维素钠 Sodium carboxymethylcellulose	2.0
合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 CP	39.80
粗脂肪 EE	7.81
粗灰分 Ash	7.48

[1)]无维生素 E 的维生素预混料为每千克饲料提供 Vitamin E-free vitamin mix provided the following per kg of the diet：VA 1.0 g，VD_3 0.63 g，VC 14 g，VK_3 1.8 g，VB_1 0.75 g，VB_6 1 g，VB_{12} 0.15 g，烟酸 nicotinic acid 5 g，核黄素 riboflavin 2.63 g，对氨基苯甲酸 aminobenzoic acid 5 g，泛酸钙 calcium pantothenate 5 g，生物素 biotin 0.75 g，叶酸 folic acid 0.19 g，肌醇 inositol 60 g，α-纤维素 α-cellulose 902.1 g。

[2)]矿物质预混料为每千克饲料提供 The mineral premix provided the following per kg of the diet：KCl 0.84 g，$MgSO_4•7H_2O$ 3 g，NaH_2PO_4 6.45 g，KH_2PO_4 3 g，$Ca(H_2PO_4)_2•H_2O$ 7.95 g，$CaCO_3$ 3.15 g，$C_6H_{10}CaO_6•5H_2O$ 4.95 g，$FeC_6H_5O_7•5H_2O$ 0.36 g，$ZnSO_4•7H_2O$ 0.142 8 g，$MnSO_4•H_2O$ 0.032 1 g，$CuCl_2•2H_2O$ 0.070 4 g，Na_2SeO_3 0.001 3 g，$AlCl_3•6H_2O$ 0.004 5 g，$CoCl_2•6H_2O$ 0.042 g，KI 0.006 9 g。

[3)]诱食剂含 Attractant content：丙氨酸 alanine 0.6%，甘氨酸 glycine 0.6%，谷氨酸 glutamic acid 0.6%，甜菜碱 betaine 1.2%。

采用中华人民共和国国家标准 GB/T 17812—2008 的高效液相色谱法测定试验饲料中维生素 E 实际含量分别为 18.31、37.94、66.07、120.25、212.68 和 388.96 mg/kg。按照 AOAC[25] 标准，测定饲料常规成分，每个样品设置 3 个重复。粗蛋白质含量测定采用凯氏定氮法测定；粗脂肪含量采用索氏抽提法测定；粗灰分含量测定是先于 200 ℃碳化样品至不冒烟，再于

550 ℃马弗炉中灼烧至恒重；水分含量是采用在 105 ℃烘干到恒重的方法进行分析。

1.3 养殖管理

养殖试验于 2015 年 7—9 月于浙江湖州壮大水产养殖场进行。试验期间连续充氧保持溶氧>6.5 mg/L。养殖的水质条件为：水温 25~30 ℃，总氨氮<0.1 mg/L。养殖期间，每天投喂饲料 2 次，分别为 08:00 和 16:00。光照为自然光照，养殖水为自然河水。为了保持养殖水质，每天吸出日本沼虾排泄物并换 1/3 的养殖水量。每只水槽内放置一定量的网片作为日本沼虾的躲避物，以减少沼虾为争抢饲料而进行互相残杀。

1.4 样品采集

养殖试验结束后，养殖虾饥饿 24 h，计数、称重用于生长指标的分析。采集各组日本沼虾肝胰腺，−80 ℃保存，用于后续抗氧化相关酶活力测定及基因表达分析。

1.5 氨氮胁迫试验

养殖试验结束后，每组留取 60 只日本沼虾（每个水槽留 20 只）用于氨氮胁迫试验，胁迫试验每组设 3 个平行，每个平行 20 只虾。根据 Wang 等[26]试验结果，设定胁迫试验的总氨氮浓度为 37 mg/L。胁迫用试剂为氯化铵，先配制 10 g/L 的氯化铵母液，而后根据水槽体积将适量母液加入，以调成所设定的胁迫浓度（37 mg/L）。水体中氨氮浓度采用纳氏试剂法[27]测定，每隔 6 h 测定养殖水体氨浓度并用氯化铵母液进行调节。胁迫 24 h 后，采集日本沼虾肝胰腺并于−80 ℃用于后续的酶活力测定和基因表达分析。

1.6 指标测定

1.6.1 生长性能指标的测定

生长性能相关指标按照以下公式进行计算：

成活率（survival rate，SR，%）=100×试验结束时存活的虾个数/试验开始时放入的虾个数；

增重率（weight gain rate，WGR，%）=100×（试验结束时虾均重－试验开始时虾均重）/试验开始时虾均重；

饲料系数（feed conversion rate，FCR）=饲料摄入量/（虾末均重－虾初均重）；

摄食率（feeding rate，FR，%）=100×摄入饲料总量/[试验天数×（末总重+初总重）/2]。

1.6.2 肝胰腺抗氧化酶活力及丙二醛含量测定

准确称取肝胰腺 0.50~0.70 g 于 2 mL 无菌离心管中，加入 9 倍体积的预冷生理盐水，电动匀浆 10~20 s，制成 10%匀浆液。4 ℃、4000 r/min 离心 10 min，收集上清液（即为待测液）用于后续的酶活力和 MDA 含量测定。测定时，每组设 3 个重复。待测液中蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法进行测定。酶活力和 MDA 含量测定采用相应的各商用试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

SOD 活力测定：采用 Elstner 等[28]的黄嘌呤氧化酶法。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统生成超氧根离子（O^{2-}·），而后 O^{2-}·会氧化羟胺生成在显色剂的作用下呈现紫红色的亚硝酸盐。当被测样品中含 SOD 时，SOD 会专一性的抑制 O^{2-}的生成，从而减少亚硝酸盐的产生量。定义 1 个 SOD 活力单位（U）就是 1 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制效率达到 1/2 时所对应的 SOD 量。

CAT 活力测定：采用 Aebi[29]的过氧化氢（H_2O_2）含量的减少来进行测定。每分钟还原 1 μmol H_2O_2 所需 CAT 的量定义为 1 个酶活力单位。

GSH-Px 活力测定：通过分析 GSH-Px 催化的谷胱甘肽（GSH）与 H_2O_2 的反应中 GSH 的减少量来测定酶活力[30]。1 mg 蛋白质，去除非酶反应的作用，每分钟使反应体系中 GSH 浓度下降 1 μmol/L 时定义为 1 个 GSH-Px 活力单位。

T-AOC 测定：机体内铁离子在抗氧化物质催化下还原生成的亚铁离子与啡啉类物质形成稳定络合物，通过 520 nm 光吸收值变化测定抗氧化能力的高低[31]。37 ℃下，每分钟时间内，1 mg 组织蛋白使反应体系的光吸收值每增加 0.01 时定义为 1 个 T-AOC 单位。

采用硫代巴比妥酸（TBA）法[32]测定日本沼虾肝胰腺组织中 MDA 含量变化，以此来评估机体脂质过氧化的程度。硫代巴比妥酸与脂质过氧化中的产物 MDA 缩合形成红色产物，根据颜色变化于 532 nm 进行比色。

1.6.3　mRNA 表达量分析

采用组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒（Aidlab，北京）提取各组总 RNA，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性，与此同时，RNA 纯度和浓度用 Thermo NanoDrop 2000 核酸蛋白测定仪检测。用 Takara（大连）反转录试剂盒 PrimeScript^{TM} RT reagent Kit 将总 RNA 反转录合成 cDNA，并于−20 ℃保存备用。

用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)对胁迫前

后各组日本沼虾肝胰腺中编码热休克蛋白（heat shock proteins，*HSP*）60 和 90、热休克同源蛋白 70（heat shock cognate protein 70，*HSC70*）、硫氧还蛋白（thioredoxin，*Trx*）和硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase，*TrxR*）的基因水平表达进行定量分析，β 肌动蛋白（β-actin）作为 qRT-PCR 反应中的内参基因。测定时，每组设 3 个重复。qRT-PCR 所用引物见表 2。采用康为 CWBIO（北京）的实时荧光定量试剂盒 UltraSYBR Mixture 进行 PCR 反应。PCR 反应体积为 20 μL，包括 10 μL 2 × UltraSYBRMixture、引物（10 μmol/L）各 0.5 μL、1 μL cDNA、8 μL ddH_2O。qRT-PCR 反应条件为：95 ℃预变性 10 min，94 ℃变性 15 s，58 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 20 s，共 40 个循环；PCR 反应后绘制熔解曲线以判断扩增产物的正确性，温度以 0.5 ℃/5 s 的速度从 60 ℃上升到 95 ℃。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对基因表达量进行分析[33]。

表 2　qRT-PCR 引物序列

Table 2　Primer sequence for qRT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence （5’—3’）	扩增产物 Amplification product/bp	扩增效率 Amplification efficiency/%	登录号 Accession No.
热休克蛋白 60 *HSP*60	S：ATGAAGAGGCTGGAGATG A：GTGGTTACTTGCCGAGAT	175	98.8	KF028596
热休克同源蛋白 70 *HSC*70	S：GCGTCTTATTGGTGATGC A：TAAAGGGCCAATGTTTCA	134	101.2	DQ660140
热休克蛋白 90 *HSP*90	S：GAAGGAAAGGGACAAGGA A：GGTCCATAAAGGCTTGGT	238	99.1	GU319963
硫氧还蛋白 *Trx*	S：GGTGTGGTCCATGTAAGCTT A：ATAAGCCGGTTGACAAATGC	229	99.1	KY465768
硫氧还蛋白还原酶	S：AAGTCCTACTGCCCGTTTTG A：CACCACCAAGATGTTCACCA	181	97.6	KY465769

TrxR				
β肌动蛋白 β-actin	S：GTGCCCATCTACGAGGGTTA A：CGTCAGGGAGCTCGTAAGAC	247	99.6	FL589653

S:正向引物 sense primer；A:反向引物 anti-sense primer。

1.7 统计分析

试验数据用平均值±标准误表示。对胁迫前或胁迫后，不同维生素 E 水平组间数据采用单因素方差分析（one-way ANOVA），当不同组间有显著差异时，用 Turkey 检验进行多重比较；同一组胁迫前后采用 *t*-检验方法进行分析，显著水平为 0.05，所有数据均使用 SPSS 19.0 软件进行处理分析。成活率数据在分析前先进行反正弦转换。

2 结 果

2.1 维生素 E 对日本沼虾生长性能的影响

由表 3 可见，日本沼虾的成活率不受饲料中维生素 E 水平的影响，虽然 VE4 组的成活率达到最高（86%），但各组间没有显著性差异（*P*>0.05）。随着饲料中维生素 E 水平的增加，日本沼虾的增重率呈现先升高后下降的变化趋势，VE4 组达到最高，且显著高于 VE1 组（*P*<0.05），但与其余 4 组的差异不显著（*P*>0.05）。各组日本沼虾的饲料系数呈与增重率相反的变化趋势，VE4 组最低，且显著低于 VE1 组（*P*<0.05）。饲料维生素 E 水平对日本沼虾的摄食率影响不显著（*P*>0.05）。

表 3 维生素 E 对日本沼虾生长性能的影响

Table 3 Effects of viatmin E on growth performance of *Macrobrachium nipponense*

组别 Groups	初重 IW/g	末重 FW/g	增重率 WGR/%	成活率 SR/%	饲料系数 FCR	摄食率 FR/%
VE1	0.119±0.004	0.450±0.002[a]	278.00±1.78[a]	81.2±2.15	1.94±0.05[b]	3.84±0.11
VE2	0.119±0.002	0.533±0.011[ab]	346.67±9.40[ab]	83.2±3.14	1.78±0.03[ab]	3.89±0.06
VE3	0.119±0.003	0.557±0.048[ab]	367.86±40.38[ab]	79.2±4.08	1.73±0.05[ab]	3.81±0.01
VE4	0.119±0.003	0.627±0.069[b]	426.37±57.88[b]	86.0±3.29	1.66±0.06[a]	3.90±0.08
VE5	0.119±0.002	0.540±0.015[ab]	353.38±12.78[ab]	79.6±2.22	1.74±0.04[ab]	3.78±0.05
VE6	0.119±0.003	0.560±0.040[ab]	370.73±33.76[ab]	81.6±2.14	1.74±0.05[ab]	3.87±0.01

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），相同或无字母表示差异不显著（P>0.05）。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05).

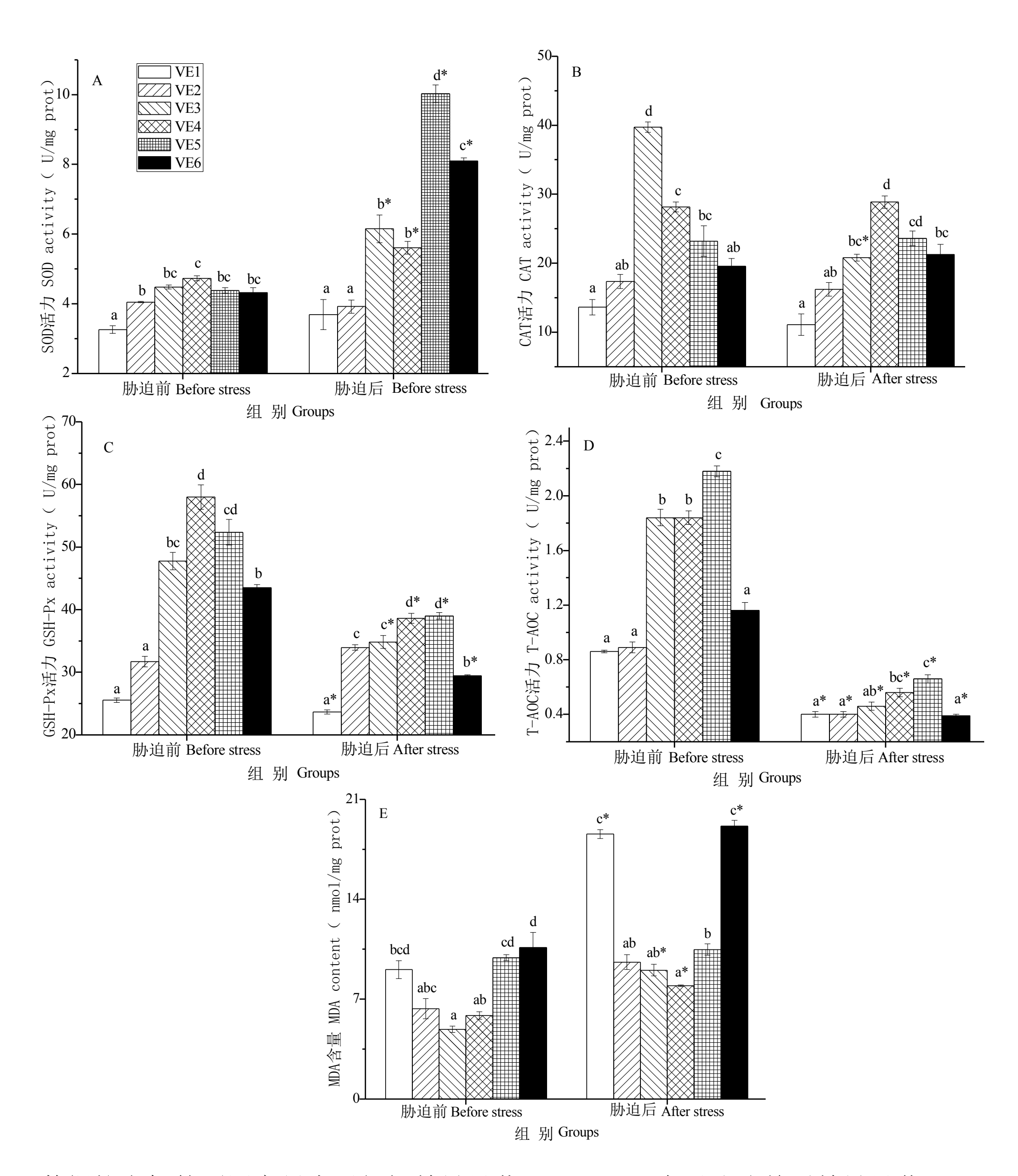
2.2　维生素 E 对日本沼虾肝胰腺抗氧化酶活力及 MDA 含量的影响

如图 1 所示，饲料维生素 E 水平对日本沼虾肝胰腺的抗氧化酶活力和 MDA 含量均产生影响。胁迫前，随着饲料维生素 E 水平的增加，日本沼虾肝胰腺的 SOD 活力也随之增加，并于 VE4 组（120.25 mg/kg）达到最高，而后呈下降趋势，且 VE4 组肝胰腺的 SOD 活力显著高于 VE1 和 VE2 组（P<0.05），但与 VE3、VE5 和 VE6 组间差异不显著（P＞0.05）。胁迫后，肝胰腺的 SOD 活力变化趋势与胁迫前类似，在 VE5 组（212.68 mg/kg）达到最高，显著高于其他各组（P<0.05），VE1 和 VE2 组肝胰腺的 SOD 活力显著低于其他各组（P<0.05）。VE3、VE4、VE5 和 VE6 组胁迫后日本沼虾肝胰腺的 SOD 活力均显著高于胁迫前（P<0.05），VE1 和 VE2 组胁迫前后日本沼虾肝胰腺的 SOD 活力差异不显著（P>0.05）。

随饲料维生素 E 水平的变化，胁迫前后日本沼虾肝胰腺的 GSH-Px、CAT 活力和 T-AOC 均呈与胁迫前肝胰腺的 SOD 活力类似的变化趋势。胁迫前后，VE4 和 VE5 组日本沼虾肝胰腺的 GSH-Px 活力均较高，且显著高于 VE1、VE2 和 VE6 组（P<0.05）。除 VE2 组胁迫前后日本沼虾肝胰腺的 GSH-Px 活力无显著差异（P>0.05）外，其余组胁迫后肝胰腺的 GSH-Px 活力均显著低于胁迫前（P<0.05）。

无论胁迫前还是胁迫后，VE3、VE4 和 VE5 组日本沼虾肝胰腺的 CAT 活力均较高，VE1 组则最低；与胁迫前相比，VE3 组胁迫后日本沼虾肝胰腺的 CAT 活力显著降低（P<0.05），其余各组胁迫前后肝胰腺的 CAT 活力差异不显著（P>0.05）。无论胁迫前后，VE5 组肝胰腺的 T-AOC 均为最高，其次是 VE3 和 VE4 组；VE1、VE2 和 VE6 组肝胰腺的 T-AOC 较低，显著低于 VE5 组（P<0.05）。与胁迫前相比，胁迫后各组肝胰腺的 T-AOC 均显著下降（P<0.05）。

随着饲料维生素 E 水平的升高，胁迫前或胁迫后日本沼虾肝胰腺的 MDA 含量均呈先下降后上升的变化趋势，在 VE2、VE3 和 VE4 组（37.94~120.25 mg/kg）含量较低，且显著低于 VE6 组（P<0.05）。与胁迫前相比，胁迫后各组肝胰腺的 MDA 含量均升高，且 VE1、VE3、VE4 和 VE6 组胁迫后的肝胰腺的 MDA 含量显著高于胁迫前（P<0.05）。



数据柱上标的不同字母表示组间差异显著（P<0.05），*表示胁迫前后差异显著（P<0.05）。下图同。

Value columns with the different letters mean significant difference in different groups (P<0.05), * mean significant difference before and after stress (P<0.05). The same as below.

图 1　维生素 E 对胁迫前后日本沼虾肝胰腺 SOD(A)、CAT(B)、GSH-Px(C)活力和 T-AOC(D)及 MDA(E)含量的影响

Fig.1　Effects of vitamin E on activities of SOD (A),CAT (B), GSH-Px (C) and T-AOC (D) and MDA (E) content in hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense* before and after stress

2.3　维生素 E 对日本沼虾肝胰腺 mRNA 表达量表达的影响

如图 2 所示，胁迫前，随饲料维生素 E 水平的增加，日本沼虾肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量呈先下降后上升的变化趋势，VE3 组肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量最低，显著低于其他各组（*P*<0.05）；VE6 组肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量最高，显著高于其他各组（*P*<0.05）。胁迫后，各组肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量变化趋势与胁迫前相反，VE3 组最高，且显著高于 VE1 和 VE2 组（*P*<0.05）。胁迫后 VE3 组肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量显著高于胁迫前（*P*<0.05）；其余各组肝胰腺 *HSP*60 mRNA 表达量均低于胁迫前，且 VE1、VE4 和 VE6 组显著低于胁迫前（*P*<0.05）。

无论胁迫前后，VE3、VE4、VE5 和 VE6 组日本沼虾肝胰腺 *HSC*70 mRNA 表达量均较高，显著高于 VE1 组（*P*<0.05）。胁迫后各组肝胰腺 *HSC*70 mRNA 表达量均低于胁迫前，且在 VE1 组差异显著（*P*<0.05）。

胁迫前，日本沼虾肝胰腺 *HSP*90 mRNA 表达量随饲料维生素 E 水平增加呈下降趋势，VE1 和 VE2 组的肝胰腺 *HSP*90 mRNA 表达量显著高于其他各组（*P*<0.05）；胁迫后，随饲料维生素 E 水平增加，肝胰腺 *HSP*90 mRNA 表达量呈先升高后下降变化趋势，且 VE3 组显著高于其他各组（*P*<0.05），VE1 组显著低于其他各组（*P*<0.05）。氨氮胁迫显著降低各组肝胰腺 *HSP*90 mRNA 表达量（*P*<0.05）。

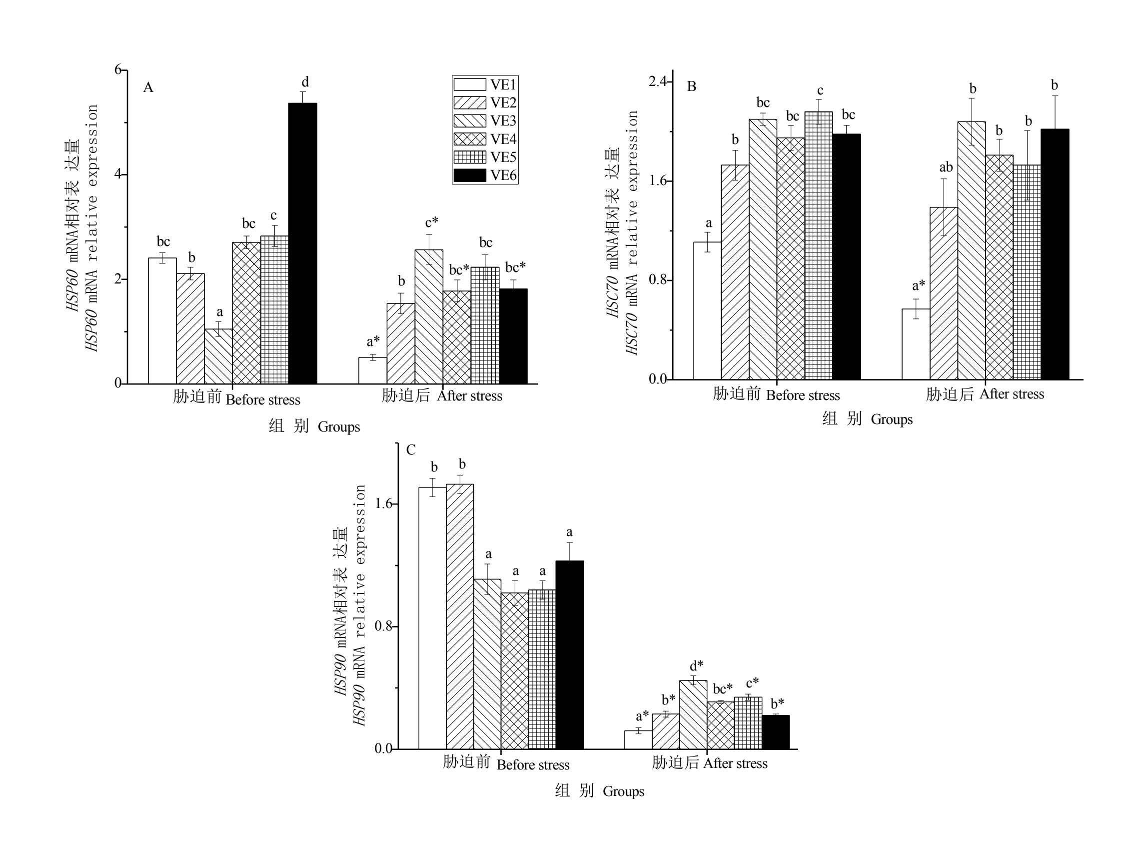


图 2 维生素 E 对胁迫前后日本沼虾肝胰腺 *HSP*60(A)、*HSC*70(B)和 *HSP*90(C)mRNA 表达量的影响

Fig. 2 Effects of viatamin E on expressions of *HSP*60 (A), *HSC*70 (B) and *HSP*90 (C) in hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense* before and after stress

如图 3 所示，随饲料维生素 E 水平的增加，胁迫前后各组日本沼虾肝胰腺 *Trx* mRNA 表达量呈先下降后上升的变化趋势，VE2、VE3、VE4 和 VE5 组肝胰腺 *Trx* mRNA 表达量较低，且胁迫前显著低于 VE6 组（$P<0.05$）。胁迫后肝胰腺 *Trx* mRNA 表达量低于胁迫前，除 VE3、VE4 和 VE5 组胁迫前后差异不显著（$P>0.05$）外，其余 3 组胁迫后显著低于胁迫前（$P<0.05$）。

胁迫前后日本沼虾肝胰腺 *TrxR* mRNA 表达量先是随着饲料维生素 E 水平的增加而增加，VE2 和 VE3 组显著高于其余各组（$P<0.05$），而后呈下降趋势。胁迫后 VE2、VE3、VE4、VE5 和 VE6 组肝胰腺 *TrxR* mRNA 表达量显著低于胁迫前（$P<0.05$）。

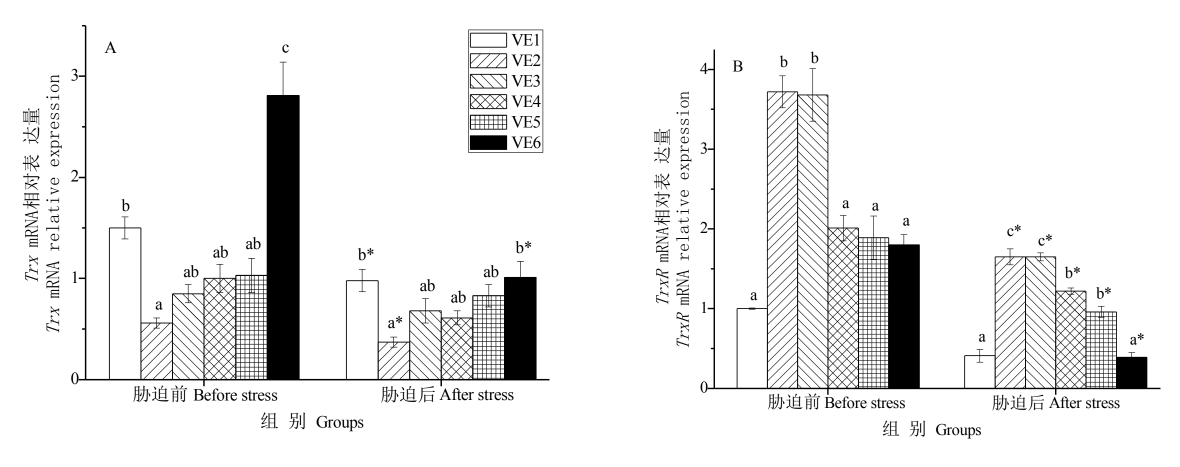


图 3 维生素 E 对胁迫前后日本沼虾肝胰腺 *Trx*(A)和 *TrxR*(B)mRNA 表达量的影响

Fig. 3 Effects of viatamin E on expressions of *Trx* (A) and *TrxR* (B) mRNA in hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense* before and after stress

3 讨 论

3.1 维生素 E 对日本沼虾生长性能的影响

已有研究显示：饲料中添加维生素 E 可显著提高斑节对虾[4]、南美白对虾（*Penaeus vannamei*）[34]和大比目鱼（*Scophthalmus maximus*）[35]等的增重率或特定生长率，降低饲料系数[35]。本研究也发现饲料中添加维生素 E 可提高日本沼虾幼虾的生长性能，且维生素 E

含量为 120.25 mg/kg（VE4 组）时日本沼虾的生长性能达到最佳，饲料系数最低；低水平维生素 E（18.31 mg/kg）对日本沼虾的生长性能产生抑制效应；高水平维生素 E（388.87 mg/kg）虽与 VE4 组差异不显著，但呈下降的变化趋势，我们推测更高的饲料维生素 E 水平可能会对日本沼虾生长产生显著抑制效应。据报道，高水平的维生素 E 具有降低大比目鱼[35]、斑节对虾[4]生长性能的趋势，但对南美白对虾[34]、青鱼[16]的增重率或特定生长率无影响。可见，过量维生素 E 对不同物种的影响存在差异性，这可能是因为物种特异性、动物发育不同阶段和维生素 E 的不同添加形式等因素造成的。本研究中日本沼虾的增重率（278%~426%）低于商用饲料的试验结果[36]，饲料系数偏高。这可能是因为日本沼虾属于杂食性偏食动物性饵料[37]，对饲料中鱼粉含量变化比较敏感，半纯化饲料中鱼粉含量较低，降低饲料适口性，导致生长性能不佳[38-39]。

3.2　维生素 E 对日本沼虾肝胰腺抗氧化性能的影响

MDA 是脂质过氧化的产物，常被用来衡量机体内源性氧化损伤的状态。本研究发现维生素 E 缺乏和过量可提高日本沼虾肝胰腺 MDA 含量，添加适量维生素 E（66.07~120.25 mg/kg）显著降低日本沼虾肝胰腺 MDA 含量。类似地，饲料中添加适量维生素 E 可显著降低草鱼（*Ctenopharyngodon idella*）[40]和军曹鱼（*Rachycentron canadum*）[41]组织中 MDA 的积累。可见饲料维生素 E 缺乏或过量可在日本沼虾体内诱导氧化胁迫。为了减少氧化胁迫，维持体内自由基的动态平衡，生物体进化出了多种抗氧化防御反应，比如专化的抗氧化酶如 SOD、CAT 和 GSH-Px 等[42]。本研究中，饲料维生素 E 水平对日本沼虾幼虾肝胰腺的抗氧化酶活力产生显著影响，维生素 E 含量为 66.07~212.68 mg/kg（VE3、VE4 和 VE5 组）时可显著提高日本沼虾肝胰腺 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力。此外，随着饲料维生素 E 水平的变化，T-AOC 变化趋势与抗氧化酶活力类似。已有研究者在南美白对虾[5]、草鱼[40]、大菱鲆（*Scophthalmus maximus* L.）[43]和罗非鱼[44]等物种中发现了相似的研究结果。

与此同时，动物体内的一些氧化还原系统如 Trx 系统在抗氧化方面也发挥着至关重要的作用。Trx 系统由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）、TrxR 和 Trx 组成，可为体内多种酶提供电子，从而参与体内自由基清除、氧化还原状态的维持、细胞凋亡、DNA 和蛋白质修复等生理过程[45]。目前研究多集中于各种胁迫下 *Trx* 和 *TrxR* mRNA 表达量变化[46-47]。此外，机体营养水平与 *Trx* 和 *TrxR* mRNA 表达量间的关系也有零星报道[48-50]，这为

通过营养学方法缓解胁迫提供依据。本研究结果显示，饲料维生素 E 水平显著影响日本沼虾肝胰腺 *Trx* 和 *TrxR* mRNA 表达量。过低或过高维生素 E 水平可诱导日本沼虾 *Trx* mRNA 的表达，但安清聪等[50]发现维生素 E 缺乏抑制猪胎儿皮肤成纤维细胞中 *Trx* 的表达。这可能是因为维生素 E 对 *Trx* 基因表达的影响具有物种特异性，但具体机制有待进一步研究。外界因素如高温、感染、H_2O_2 等易诱导 *Trx* 的表达[51]。维生素 E 作为一种抗氧化剂，其缺乏可在体内产生氧化胁迫，添加过量可能在体内产生促氧化作用[52]。本研究结果表明，维生素 E 缺乏或过量可使日本沼虾体内氧自由基增多，引起氧化胁迫，诱导了 *Trx* 的表达。然而，随着饲料中维生素 E 水平的变化，日本沼虾肝胰腺 *TrxR* mRNA 表达量变化与 *Trx* mRNA 表达量的变化趋势相反，添加适量的维生素 E 对 *TrxR* mRNA 表达量具有积极的促进作用。据报道，适量的硒可诱导机体 *TrxR* 的表达[49,53]。可见，维生素 E 水平影响日本沼虾 *TrxR* 表达，过低或过高维生素 E 引起氧化胁迫，抑制基因的表达。

鉴于以上结果，我们可知维生素 E 缺乏，日本沼虾肝胰腺抗氧化能力降低，肝胰腺 MDA 含量升高，脂质过氧化，降低抗氧化相关酶活性或基因的表达；维生素 E 过高则带来促氧化作用，破坏日本沼虾体内的氧化-抗氧化动态平衡，自由基增多，产生氧化损伤，抑制了抗氧化酶的表达；但氧化应激诱导了 *Trx* 的表达以应对胁迫。

3.3 维生素 E 对日本沼虾肝胰腺 *HSP*60、*HSC*70 和 *HSP*90 mRNA 表达量的影响

HSP 是生物细胞在受到应激原（生物应激、理化因素等）刺激后诱导产生的一类高度保守的蛋白质，在维持蛋白质构象、抗凋亡、细胞保护等方面具有积极作用[54]。研究发现，饲料中维生素 E 的缺乏或过量可显著诱导 *HSP*60 转录水平的表达。同时，维生素 E 缺乏组的 *HSP*90 mRNA 表达量也显著高于维生素 E 添加组，以上结果与适量维生素 E 可降低山羊 *HSP* 表达的规律相似[55]。这进一步说明维生素 E 不足或过量引起氧化胁迫，诱导日本沼虾高表达 *HSP*60 和 *HSP*90 以提供保护作用。HSC70 为 HSP70 中的一种，属于热休克同源蛋白，在正常细胞中有较高的表达量，参与机体细胞的分裂、增殖及免疫等生理过程[56]。据报道，*HSC*70 表达可受机体营养水平的影响，如团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)*HSC*70 mRNA 表达可受饲料维生素 C 的诱导[57]。在本研究中，维生素 E 缺乏显著降低了日本沼虾肝胰腺虾 *HSC*70 mRNA 表达量，表明补充维生素 E 能提高 *HSC*70 表达 mRNA 表达量，增强对机体的保护作用。

3.4　维生素 E 对氨氮胁迫日本沼虾的缓释作用

本研究发现，氨氮胁迫后，饲料的维生素 E 水平≥66.07 mg/kg 组（VE3、VE4、VE5 和 VE6 组）日本沼虾肝胰腺的 SOD 活力显著高于胁迫前，说明对于维生素 E 补充组，短期氨氮胁迫诱导了 *SOD* 的表达。类似地，有研究者发现短期氨氮胁迫也可显著提高克氏原螯虾（*Procambarus clarkii*）[58]、中华绒螯蟹（*Eriocheir sinensis*）[59]的 SOD 活力。这可能因为是短期的胁迫会对 *SOD* 表达具有一种暂时的刺激兴奋效应[60]，提高 *SOD* 表达，以提高机体应对胁迫的能力，但维生素 E 缺乏，则不能产生这种刺激效应。同时，氨氮胁迫显著降低了日本沼虾肝胰腺的 T-AOC 和 GSH-Px 活力，提高 MDA 含量，相似的研究结果发现于中国对虾（*Fenneropenaeus chinensis*）[61]。

据报道，胁迫可影响机体 *TrxR* 和 *Trx* 的表达，如甲基汞暴露可降低鱼肝脏中 Trx 和 TrxR 活性[47]；高浓度石英粉尘使人胚肺成纤维细胞的 *Trx* 和 *TrxR* 基因和蛋白质水平表达显著下调[46]。与此类似，我们发现氨氮胁迫可降低日本沼虾肝胰腺 *TrxR* 和 *Trx* mRNA 表达量，但 VE3、VE4 和 VE5 组 *Trx* mRNA 表达量在胁迫前后差异不显著。以上结果表明：氨氮胁迫可通过下调抗氧化酶活性和 Trx 系统中 *Trx* 和 *TrxR* mRNA 表达量，导致体内氧化产物 MDA 积累，从而加重日本沼虾体内的氧化损伤。但胁迫后，适量维生素 E 组的 T-AOC 和 GSH-Px、CAT 活力及 *Trx*、*TrxR* mRNA 表达量高于维生素 E 缺乏或过量组，说明添加适量水平的维生素 E 对氨氮胁迫具有一定的保护作用。

氨氮胁迫对日本沼虾肝胰腺 *HSP*60、*HSC*70 和 *HSP*90 mRNA 表达量产生不同影响。*HSP*90 在正常细胞中具有较高表达量，参与信号传导、细胞降解、免疫等多个生理过程[62]。本研究发现氨氮胁迫显著抑制 *HSP*90 的表达，但胁迫后，添加适量维生素 E 组的 *HSP*90 mRNA 表达量显著高于维生素 E 缺乏和过量组。与此类似，氨氮胁迫 48 h 后可降低中国对虾 *HSP*90 的表达[61]。胁迫后 VE1 组 *HSC*70 mRNA 表达量显著低于胁迫前；胁迫后维生素 E 缺乏和过量组 *HSP*60 mRNA 表达量显著低于胁迫前，但 VE3 组 *HSP*60 mRNA 表达量显著高于胁迫前。可见，氨氮胁迫后 *HSP* 表达水平下降可能是氨氮胁迫诱导组织损伤有关，但添加适量的维生素 E 可以提高 *HSP* 表达，提高日本沼虾应对胁迫的能力。

4　结　论

① 饲料维生素 E 水平对日本沼虾幼虾生长性能和抗氧化性能产生显著影响，适量水平

的维生素 E（66.07~212.68 mg/kg）对其生长性能和抗氧化性能具有积极的促进作用。

② 维生素 E 缺乏或过量可诱导日本沼虾 *HSP*60 和 *HSP*90 mRNA 的表达，但对 *HSC*70 mRNA 表达产生抑制效应。

③ 氨氮胁迫降低了日本沼虾抗氧化性能，但添加适量的维生素 E（66.07~212.68 mg/kg）可提高日本沼虾应对胁迫的能力。

参考文献：

[1] 美国科学院国家研究委员会.鱼类与甲壳类营养需求[M].麦康森,李鹏,赵建民,译.北京:科学出版社,2015:9,215–217

[2] GALLI F,AZZI A,BIRRINGER M,et al.Vitamin E:Emerging aspects and new directions[J].Free Radical Biology & Medicine,2016,102:16–36.

[3] HAMRE K.Metabolism,interactions,requirements and functions of vitamin E in fish[J].Aquaculture Nutrition,2011,17(1):98–115.

[4] LEE MH,SHIAU SY.Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp,*Penaeus monodon*,and effects on non-specific immune responses[J].Fish & Shellfish Immunology,2004,16(4):475–485.

[5] LIU Y,WANG WN,WANG AL,et al.Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) exposed to acute salinity changes[J].Aquaculture,2007,265(1/2/3/4):351–358.

[6] GRIBOFF J,MORALES D,BERTRAND L,et al.Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*:the protective effect of vitamin E[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2014,108:1–8.

[7] KAN Y,CENGIZ EI,UGURLU P,et al.The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin[J].Environmental Toxicology and Pharmacology,2012,34(2):170–179.

[8] SALEHI I,KARAMIAN R,KOMAKI A,et al.Effects of vitamin E on lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity[J].Brain Research,2015,1629:270–281.

[9] LIU B,XU P,XIE J,et al.Effects of emodin and vitamin E on the growth and crowding stress of *Wuchang* bream (*Megalobrama amblycephala*)[J].Fish & Shellfish Immunology,2014,40(2):595–602.

[10] 牛化欣,雷霁霖,常杰,等.维生素 E 对高脂饲料养殖大菱鲆生长、脂类代谢和抗氧化性能的影响[J].中国水产科学,2014,21(2):291–299.

[11] REN Q,PAN L Q.Digital gene expression analysis in the gills of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) exposed to elevated ambient ammonia-N[J].Aquaculture,2014,434:108–114.

[12] YUE F,PAN L Q,XIE P,et al.Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part A:Molecular & Integrative Physiology,2010,157(3):246–251.

[13] ROMANO N,ZENG C S.Subchronic exposure to nitrite,potassium and their combination on survival,growth,total haemocyte count and gill structure of juvenile blue swimmer crabs,*Portunus pelagicus*[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2009,72(4):1287–1295.

[14] 洪美玲,陈立侨,顾顺樟,等.氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J].中国水产科学,2007,14(3):412–418.

[15] OLIVA-TELES A.Nutrition and health of aquaculture fish[J].Journal of Fish Diseases,2012,35(2):83–108.

[16] 黄云,胡毅,文华,等.维生素 E 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响[J].水生生物学报,2013,37(3):507–514.

[17] 施兆鸿,张艳亮,高权新,等.饲料维生素 E 水平影响云纹石斑鱼幼鱼对氨氮胁迫的响应[J].动物营养学报,2015,27(5):1596–1604.

[18] 李新正,刘瑞玉,梁象秋.中国动物志(第四十四卷)[M].北京:科学出版社,2007:128–131.

[19] YANG Y,XIE S Q,LEI W,et al.Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*[J].Fish & Shellfish Immunology,2004,17(2):105–114.

[20] 农业部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴 2015[M].北京:中国农业出版社,2016:30.

[21] 丁志丽,张易祥,叶金云,等.鱼粉蛋白与发酵酶解豆粕蛋白不同配比对日本沼虾生长及免疫性能的影响[J].动物营养学报,2015,27(1):154–164.

[22] 斯烈钢,邹李昶,申屠基康,等.饲料添加不同脂肪及蛋白质水平对日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)生长性能、体成分及消化酶活力的影响[J].海洋与湖沼,2014,45(2):400–408.

[23] KONG Y Q,DING Z L,DU Z Y,et al.Dietary Copper Requirement of juvenile oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*,and its effects on growth,antioxidant activities,and resistance to *Aeromonas hydrophila*[J].The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh,2014,10:100-112.

[24] 孔有琴,陈立侨,丁志丽,等.日本沼虾 *MT* 基因克隆、组织差异性表达及与饲料铜、锌含量的相关性[J].水生生物学报,2015,39(6):1126–1133.

[25] Association of Official Analytical Chemists (AOAC).Official methods of analysis[M].Arlington,VA,USA:Association of Official Analytical Chemists1995:1141.

[26] WANG A L,WANG W N,WANG Y,et al.Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption,ammonia-N excretion and Na^{+}/K^{+} ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia[J].Aquaculture,2003,220(1/2/3/4):833–841.

[27] HEGAZI M M,ATTIA Z I,ASHOUR O A.Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure[J].Aquatic Toxicology,2010,99(2):118–125.

[28] ELSTNER E F,HEUPEL A.Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride:a simple assay for superoxide dismutase[J].Analytical Biochemistry,1976,70(2):616–620.

[29] AEBI H.Catalase *in vitro*[J].Methods in Enzymology, 1984,105:121–126.

[30] SEDLAK J,LINDSAY R H.Estimation of total,protein-bound,and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent[J].Analytical Biochemistry,1968,25:192–205.

[31] TANG R,LIU H M,WANG T B,et al.Mechanisms of selenium inhibition of cell apoptosis

induced by oxysterols in rat vascular smooth muscle cells[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,2005,441(1):16–24.

[32] BUEGE J A,AUST S D.Microsomal lipid peroxidation[J].Methods in Enzymology,1978,52:302–310.

[33] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J].Methods, 2001,25(4):402–408.

[34] HE H Q,LAWRENCE A L.Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*[J].Aquaculture,1993,118(3/4):245–255.

[35] NIU H X,JIA Y D,HU P,et al.Effect of dietary vitamin E on the growth performance and nonspecific immunity in sub-adult turbot (*Scophthalmus maximus*)[J].Fish & Shellfish Immunology,2014,41(2):501–506.

[36] DING Z L,CHEN L Q,DU Z Y,et al.A mixture of fish oil and soybean oil as a dietary lipid source prevents precocity and pormotes growth in juvenile *Macrobrachium nipponense* (De Haan)[J].Aquaculture Research,2014,45(9):1567–1572.

[37] 虞冰如,沈竑.日本沼虾饲料最适蛋白质、脂肪含量及能量蛋白比的研究[J].水产学报,1990,14(4):321–327.

[38] KIM S K,TAKEUCHI T,YOKOYAMA M,et al.Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J].Aquaculture,2005,250(3/4):765–774.

[39] WANG L M,WANG J,BHARADWAJ A S,et al.Effects of dietary copper sources on growth,tissue copper accumulatioin and physiological responses of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) (Curier,1828) fed semipurified or practical diets[J].Aquaculture Research,2015,46:1619–1627.

[40] PAN J H,FENG L,JIANG W D,et al.Vitamin E deficiency depressed fish growth,disease resistance,and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*):referring to NF-κB,TOR and Nrf2 signaling[J].Fish & Shellfish Immunology,2017,60:219–236.

[41] DING Z K,LI W F,HUANG J H,et al.Dietary alanyl-glutamine and vitamin E supplements could considerably promote the expression of GPx and PPARα genes,antioxidation,feed utilization,growth,and improve composition of juvenile cobia[J].Aquaculture,2017,470:95–102.

[42] NOZIK-GRAYCK E,SULIMAN H B,PIANTADOSI C A.Extracellular superoxide dismutase[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2005,37(12):2466–2471.

[43] 李思萌,吴立新,姜志强,等.饲料脂肪源对大菱鲆幼鱼生长性能和肌肉脂肪酸组成的影响[J].动物营养学报,2015,27(5):1421-1430

[44] 李志华,付京花,唐雪莲,等.维生素 E 在罗非鱼幼鱼饲料中的应用及耐受性研究[J].动物营养学报,2013,25(7):1648–1655.

[45] LU J,HOLMGREN A.The thioredoxin antioxidant system[J].Free Radical Biology and Medicine,2014,66:75–87.

[46] 郭伟,田琳,曹建彪,等.石英对人胚肺成纤维细胞 *TrxR/Trx* 表达的影响[J].实用医学杂志,2012,28(14):2315–2317.

[47] BRANCO V,CANÁRIO J,HOLMGREN A,et al.Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury[J].Toxicology and Applied Pharmacology,2011,251(2):95–103.

[48] 张春勇,陈克嶙,黄金昌,等.谷氧还蛋白 1 和硫氧还蛋白 1 基因在云南乌金猪不同组织中的表达特点及 *L*-组氨酸对其在氧化应激细胞中表达的影响[J].动物营养学报,2012,24(12):2415–2423.

[49] 赵晓旭,杨佐君,滑静,等.硒化壳聚糖对种公鸡组织硒含量、硒酶活性及其基因表达的影响[J].动物营养学报,2013,25(5):1085–1092.

[50] 安清聪,张春勇,李美荃,等.谷氧还蛋白 1 和硫氧还蛋白 1 基因在高黎贡山猪不同组织中表达规律及维生素 E 对其在氧化应激细胞中表达的影响[J].动物营养学报,2013,25(8):1825–1835.

[51] 袁俊青.褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)*Trx*1,*TRP*14 和 *Prx*1 基因的克隆、表达和转录水平

的免疫刺激反应[D].硕士学位论文.青岛:中国海洋大学,2015:7–8.

[52] RIETJENS I M C M,BOERSMA M G,HAAN L D,et al.The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C,vitamin E,carotenoids and flavonoids[J].Environmental Toxicology and Pharmacology,2002,11(3/4):321–333.

[53] PACITTI D,WANG T,MARTIN S A M,et al.Insights into the fish thioredoxin system:expression profile of thioredoxin and thioredoxin reductase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection and *in vitro* stimulation[J].Developmental & Comparative Immunology,2014,42(2):261–277.

[54] BASU N,TODGHAM A E,ACKERMAN P A,et al.Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J].Gene,2002,295(2):173–183.

[55] 施力光,周雄,荀文娟,等.补饲硒和维生素 E 对高温季节山羊精液品质、抗氧化酶活性及热休克蛋白表达的影响[J].中国畜牧兽医,2016,43(1):101–107.

[56] 贾爱荣,王传娟,张晓华.大菱鲆组成型热休克蛋白 70 的全长 cDNA 克隆及表达分析[J].水生生物学报,2010,34(3):547–553.

[57] 明建华,谢骏,徐跑,等.大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂抗拥挤胁迫的影响[J].水生生物学报,2011,35(3):400–413.

[58] 芦光宇.氨氮和亚硝酸氮对克氏原螯虾摄食行为和抗氧化功能的影响[D].硕士学位论文.扬州:扬州大学,2012:15–16.

[59] HONG M L,CHEN L Q,SUN X J,et al.Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology,2007,145(3):363–369.

[60] STEBBING A R D.Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J].Science of the Total Environment,1982,22(3):213–234.

[61] 王芸.pH、氨氮胁迫对中国对虾细胞凋亡和抗氧化系统影响机理的研究[D].博士学位论文.上海:上海海洋大学,2011:101–122.

[62] XIE Y J,SONG L,WENG Z H,et al.HSP90,HSP60 and sHSP families of heat shock protein

genes in channel catfish and their expression after bacterial infections[J].Fish & Shellfish Immunology,2015,44(2):642–651.

Effects of Dietary Vitamin E on Growth Performance, Antioxidant Ability and Resistance to Ammonia Nitrogen Stress of *Macrobrachium nipponense*

KONG Youqin[1] DING Zhili[1] ZHANG Yixiang[1] LUO Na[1,2] YE Jinyun[1*]

(1. *Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, Key Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, Chinese Academy of Fishery Sciences, College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou* 313000, *China;* 2. *College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian* 116000, *China*)

Abstract: The present experiment was conducted to evaluate the effects of dietary vitamin E level on growth performance, antioxidant ability and resistance to ammonia nitrogen stress of juvenile *Macrobrachium nipponense*. A total of 900 healthy juvenile *Macrobrachium nipponense* with body weight of （0.119±0.004） g were selected and randomly divided into 6 groups with 3 replicates per group and 50 shrimps per replicate. Vitamin E acetate was added to basal semi-purified diet at six levels to make diets with the actual content of 18.31, 37.94, 66.07, 120.25, 212.68 and 388.96 mg /kg vitamin E (denoted by VE1, VE2, VE3, VE4, VE5 and VE6 groups, respectively), and feeding for 8 weeks. After the feeding experiment, the prawns were subjected to ammonia nitrogen stress for 24 h. The results showed as follows: 1) the survival rate of *Macrobrachium nipponense* in each group had no significant difference (P>0.05). The weight gain rate showed a trend of firstly increased and then decreased with the dietary vitamin E increasing, and prawns in VE4 group gained the highest value and significantly higher than that in VE1 group (P<0.05). The feed conversion rate had the opposite pattern from the weight gain rate, the lowest value were found in VE4 group and significantly lower than that in VE1 group (P<0.05). 2) Before ammonia nitrogen stress, the maleic dialdehyde (MDA) content in

hepatopancreas exhibited a trend of firstly decreased and then increased with dietary vitamin E increasing, the lowest value was found in VE3 group and significantly lower than that in VE1, VE5 and VE6 groups ($P<0.05$), whereas the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and total antioxidant competence (T-AOC) in hepatopancreas exhibited a trend of firstly increased and then decreased with dietary vitamin E increasing. VE1 and VE6 groups gained the higher thioredoxin (*Trx*) mRNA expression and the lower thioredoxin reductase (*TrxR*) mRNA expression. The heat shock protein 60 (*HSP*60) mRNA expression in VE3 group was significantly lower than that in other groups ($P<0.05$), the heat shock cognate 70 (*HSC*70) mRNA expression in VE1 group was significantly lower than that in other groups ($P<0.05$), the heat shock protein 90 (*HSP*90) mRNA expression in VE1 and VE2 group was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). 3) After ammonia nitrogen stress, the SOD, CAT and GSH-Px activities, MDA content and the mRNA expressions of *Trx*, *TrxR* and *HSC*70 of *Macrobrachium nipponense* in each group had the similar pattern with the before stress, but the mRNA expressions of *HSP*90 and *HSP*60 exhibited an opposite trend with the before stress. Ammonia nitrogen stress decreased the GSH-Px activities and T-AOC and the mRNA expressions of *Trx* and *TrxR*, increased MDA content and SOD activity of VE4, VE5 and VE6 groups. In conclusion, the results demonstrated that 120.25 mg/kg of dietary vitamin E increased the growth of *Macrobrachium nipponense*, 66.06, 120.25 and 212.68 mg/kg of dietary vitamin E enhanced antioxidant activity and alleviated the toxicity of ammonia nitrogen stress of *Macrobrachium nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; vitamin E; growth; antioxidan ability; ammonia nitrogen

---

*Corresponding author, professor, E-mail: yjy@zjhu.edu.cn

（责任编辑　武海龙）